

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 154905

СПОСІБ ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗМНОЖЕННЯ КРАМБЕ
(CRAMBE ABYSSINICA HOCHST.) ЗА ВИКОРИСТАННЯ УМОВ
IN VITRO

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей
03.01.2024.

Директор
Державної організації «Український
національний офіс інтелектуальної
власності та інновацій»

Ю.П. Орлюк



(11) 154905

(19) UA

(51) МПК (2023.01)
A01H 4/00

(21) Номер заявки: **u 2022 00667**

(22) Дата подання заявки: **15.02.2022**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **04.01.2024**

(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **03.01.2024, Бюл. № 1**

(72) Винахідники:

**Карпук Леся Михайлівна, UA,
Примак Іван Дмитрович, UA,
Павліченко Андрій
Андрійович, UA,
Шох Світлана Сергіївна, UA,
Шубенко Лідія Анатоліївна,
UA,
Войтовська Вікторія
Іванівна, UA,
Сторожик Лариса Іванівна,
UA,
Кононенко Лідія Михайлівна,
UA,
Кецкало Вікторія Валеріївна,
UA**

(73) Володілець:

**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
площа Соборна, 8/1, м. Біла
Церква, Київська обл., 09117,
UA**

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗМНОЖЕННЯ КРАМБЕ (CRAMBE ABYSSINICA HOCHST.) ЗА ВИКОРИСТАННЯ УМОВ IN VITRO

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambe abyssinica* Hochst.) за використання умов in vitro, що включає використання насіння, знезараження матеріалу перед введенням в асептичні умови, промивання у автоклавованій дистильованій воді, приготування живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга, додавання сахарози, укорінення і адаптацію рослин, який **відрізняється** тим, що використовують як стерилізатор розчин 35 % Білизни, для розмноження і укорінення застосовують повний склад мінеральної основи середовища MS з модифікаціями, бензиламінопурин (БАП) для розмноження та індолілоцтову кислоту (ІОК) і нафтилоцтову кислоту (НОК) для ризогенезу, здійснюють додавання сахарози для укорінення і розмноження та агар-агар і проводять пересаджування рослин у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу.

(11) **154905**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
Державна організація
«Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»
(УКРНОІВІ)

Цей паперовий документ ідентичний за документарною інформацією та реквізитами електронному документу з електронним підписом уповноваженої особи Державної організації «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій».

Паперовий документ містить 2 арк., які пронумеровані та прошиті металевими люверсами.

Для доступу до електронного примірника цього документа з ідентифікатором 0360030124 необхідно:

1. Перейти за посиланням <https://sis.nipo.gov.ua>.
2. Обрати пункт меню Сервіси – Отримати оригінал документа.
3. Вказати ідентифікатор електронного примірника цього документа та натиснути «Завантажити».

Уповноважена особа УКРНОІВІ



I.S. Матусевич

03.01.2024



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **154905** (13) **U**
(51) МПК (2023.01)
A01H 4/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2022 00667</p> <p>(22) Дата подання заявки: 15.02.2022</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.01.2024</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.01.2024, Бюл.№ 1</p>	<p>(72) Винахідник(и): Карпук Леся Михайлівна (UA), Примак Іван Дмитрович (UA), Павліченко Андрій Андрійович (UA), Шох Світлана Сергіївна (UA), Шубенко Лідія Анатоліївна (UA), Войтовська Вікторія Іванівна (UA), Сторожик Лариса Іванівна (UA), Кононенко Лідія Михайлівна (UA), Кецкало Вікторія Валеріївна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, площа Соборна, 8/1, м. Біла Церква, Київська обл., 09117 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ВЕГЕТАТИВНОГО РОЗМНОЖЕННЯ КРАМБЕ (CRAMBE ABYSSINICA HOCHST.) ЗА ВИКОРИСТАННЯ УМОВ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambe abyssinica* Hochst.) за використання умов in vitro включає використання насіння, знезараження матеріалу перед введенням в асептичні умови, промивання у автоклавованій дистильованій воді, приготування живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга, додавання сахарози, укорінення і адаптацію рослин. Використовують як стерилізатор розчин 35 % Білізни, для розмноження і укорінення застосовують повний склад мінеральної основи середовища MS з модифікаціями, бензиламінопурин (БАП) для розмноження та індолілоцтову кислоту (ІОК) і нафтилоцтову кислоту (НОК) для ризогенезу. Здійснюють додавання сахарози для укорінення і розмноження та агар-агар і проводять пересаджування рослин у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу.

UA 154905 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства і може бути використана в сільськогосподарській біотехнології, селекції і насінництві, рослинництві, овочівництві, зокрема для вирощування, збереження генотипу вихідної форми, розмноження і отримання розсади цінних селекційних матеріалів.

5 Крамбе - малопоширена перспективна олійна культура родини Brassicaceae, роду *Crambe*. Відомо близько 20 видів, в тому числі і *Crambeabyssinica* Hochst і ця рослина має багато назв: катран, гірчиця абіссінська, картан абіссінський, ефіопська гірчиця або ефіопський ріпак.

Посухостійка культура з коротким вегетаційним періодом становить інтерес як однорічна, високоврожайна, невибаглива до ґрунту та з врожайністю насіння (до 3,0 т/га), високим вмістом олії в насінні (до 46 %) і жирнокислотним складом олії. За якістю олія крамбе близька до олії з насіння білої гірчиці (воно легко рафінується та має низьке йодне число - 86-97) і може використовуватися в харчовій промисловості. Однак завдяки високому вмісту довголанцюгової ерукової кислоти (до 60 %) масло з насіння крамбе становить інтерес, в першу чергу, як джерело біодизеля. Макуха крамбе вживається для приготування особливого роду халви і тістечок, може бути використана як добриво, а надземна маса є хорошим кормом для тварин.

15 Крім того, можна її вирощувати як сидеральна культуру або в сумісних посівах. Крамбе вирощують насінням, але для прискореного вегетативного розмноження доцільно використовувати біотехнологічні методи, а саме вегетативне розмноження в умовах *in vitro*.

Відомим і найбільш близьким до корисної моделі є клональне мікророзмноження крамбе (Werner E.T., Milanez C.RJD, Gontijo A.B.PL., Soares T. C.B., Teixeira Amaral J.A, Leafana to my change related to cultivate *in vivo* and *in vitro* and during pre-acclimatization of *Crambe abyssinica* Hochst. Plant Cell Culture & Micro propagation. Plant Cell Culture & Micropropagation. Plant Cell Cult, Micropropag., Lavras, 14(1)10-17, 2018). Відомий спосіб включає у себе обробку насіння від патогенів - промивання в проточній воді з нейтральним мийним засобом. В подальшому їх помістили в асептичні умови під витяжкою з ламінарним потоком. Далі насіння знезаражували зануренням у розчин антибіотика, що містить пеніцилін (10 мг/л) та рифампіцин (10 мг/л на 30 хвилин (хв), потім 70 % спирту протягом 1 хв, комерційно доступним гіпохлоритом натрію 50 % (активний хлор: 2-2,5 %) протягом 30 хв, потім тричі промивали у автоклавованій дистильованій воді. Використовували середовище MS^{1/2}, доповнене 15 г/л агар-агару і сахарози 7 г/л і рН доводили до 5,8; далі середовище автоклавували при температурі 1,1 атм і 121 °C упродовж 20 хв. Насіння інокулювали в пробірки розміром 25×150 мм, що містять 10 мл середовища, та інкубували в кімнаті для вирощування з фотоперіодом 16/8 годин (світло/темрява) під люмінесцентними лампами, що забезпечують потік 25,2 мкмоль м-2 s-1 фотосинтетичних фотонів, і температурою 25±1 °C. Рослини, укорінювали на середовищі MS^{1/4}, з 7,5 г/л агару, без додавання сахарози. Для адаптації використовували розсаду, яку висаджували на автоклавованій комерційній субстрат (VivatoSlim®) і придатність рослин до пересаджування у ґрунт на 30 добу.

Відомий і пропонується спосіб розмноження крамбе в умовах *in vitro* мають спільні ознаки: використання насіння, знезараження матеріалу перед введенням в асептичні умови, промивання у автоклавованій дистильованій воді, приготування живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга, додавання сахарози, укорінення і адаптація рослин.

40 Проте, відомий спосіб клонального розмноження крамбе включає трудомісткі і недоцільні етапи стерилізації і експозиції та створює значне навантаження на експланти, що, в свою чергу, не дозволяє отримати високий відсоток життєздатних експлантів, не забезпечує збалансованого вуглеводного режиму у рослин-регенерантів, потребує довшого терміну адаптації укорінених клонів у відкритий або закритий ґрунт, не дає можливості отримати високий коефіцієнт розмноження і ризогенезу.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambeabyssinica* Hochst.) за використанні умов *in vitro*, що дасть можливість підібрати умови попередньої обробки насіння, використовувати доцільні стерилізатори і експозиції, що забезпечать високий відсоток життєздатних експлантів, збалансувати склад фітогормонів і вуглеводів у живильних середовищах, збільшити коефіцієнт розмноження і ризогенезу та пришвидшити адаптацію укорінених клонів у відкритий або закритий ґрунт.

55 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі насіння промивали в проточній воді з мийним засобом і знезаражували зануренням у розчин антибіотика, що містить пеніцилін (10 мг/л) та рифампіцин (10 мг/л на 30 хвилин (хв), потім 70 % спирту протягом 1 хв, комерційно доступним гіпохлоритом натрію 50 % (активний хлор: 2-2,5 %) протягом 30 хв, потім тричі промивали у автоклавованій дистильованій воді. Розмноження проводили на середовищі MS^{1/2} із 15 г/л агар-агару і сахарози 7 г/л і рН доводили до 5,8. Насіння інокулювали в пробірки

- розміром 25×150 мм, що містили 10 мл середовища, та інкубували в кімнаті для вирощування з фотоперіодом 16/8 годин (світло/темрява) під люмінесцентними лампами, температурою 25±1 °С. Рослини укорінювали на середовищі MS^{1/4}, з 7,5 г/л агару, без додавання сахарози. Для адаптації використовували розсаду, яку висаджували на автоклавований комерційний субстрат (VivatoSlim®). Запропонований спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambeabyssinica* Hochst.) за використання умов *in vitro* проводять у такій послідовності:
- 5 попередньо обробляють насіння крамбе в проточній воді з мийним засобом і стерилізують 35 % розчином Білизни за експозиції 20 хвилин та висаджують на живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга з повним набором макро- і мікроелементів та з додаванням бензиламінопурину
 - 10 (БАП) 0,5 мг/л і сахарози 30,0 г/л та агар-агару 8,0 г/л. Ризогенез здійснюють на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга з повним набором з модифікацією, індолілоцтова кислота (ІОК) і нафтилоцтова кислота (НОК) 0,3 мг/л та сахароза 30,0 г/л і агар-агар 8,0 г/л. Умови культивування: довжина фотоперіоду 16/8 годин та температура 24±2 °С. Придатність рослин до пересаджування у ґрунт можлива на 20 добу.
 - 15 Новими відмінними від існуючого близького аналога ознаками є:
 - використання як стерилізатора розчину 35 % Білизни;
 - експозиція - 20 хвилин;
 - повний склад мінеральної основи середовища МБ для розмноження і укорінення;
 - додавання БАП 0,5 мг/л для розмноження;
 - 20 - використання сахарози для укорінення і розмноження 30,0 г/л;
 - ІОК і НОК 0,3 мг/л для ризогенезу;
 - агар-агар для розмноження і укорінення 8,0 г/л;
 - пересаджування рослин у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу. Відмінні від близького аналога ознаки при взаємодії з відомими дозволяють удосконалити умови попередньої обробки
 - 25 насіння, використовувати економічно доцільні стерилізатори і експозиції, отримати високий відсоток життєздатних експлантів, збалансувати склад фітогормонів і вуглеводів у живильних середовищах, збільшити коефіцієнт розмноження і ризогенезу та пришвидшити адаптацію укорінених клонів у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу.
 - 30 Ефективність нового способу вегетативного розмноження крамбе (*Crambeabyssinica* Hochst) за використанні умов *in vitro*, вивчали на таких сортах: Політ, Деметра, Belenzian, Borowski, CRA 5/79, Галактика.
 - Експериментальні дослідження дають змогу спростувати та зменшити навантаження під час стерилізації насіння крамбе та доводять недоцільність використання знезаражування зануренням у розчин антибіотика, що містить пеніцилін (10 мг/л) та рифампіцин (10 мг/л на 30 хвилин (хв), потім 70 % спирту протягом 1 хв, комерційно доступним гіпохлоритом натрію 50 % (активний хлор: 2-2,5 %) протягом 30 хв, який використовують у відомому способі. Застосування комерційного і доступного 35 % розчину Білизни за експозиції 20 хвилин забезпечує отримання від 55 до 82 % стерильних і життєздатних експлантів крамбе та, в свою чергу, зменшує значно витрати на матеріали.
 - 40 Важливим є використання повного набору для приготування живильних середовищ за прописом Мурасіге і Скуга, а не ¹/₄ і ¹/₂. Доцільність використання сахарози 30,0 г/л є беззаперечним, адже вона діє під час культивування рослин як джерело енергії для забезпечення оптимального розвитку рослини, а також забезпечує підтримку осмотичного потенціалу і збереження води в клітинах. Крім того, для розмноження важливо додавати БАЛ
 - 45 0,5 мг/л, який належить до гормонів, забезпечує додаткове пагоноутворення у крамбе. Під час досліджень відмічено, що за відомого способу для ризогенезу не було використано ауксинів, тому нами було підібрано сумісне використання ІОК і НОК - 0,3 мг/л, які дозволили пришвидшити та на 20 добу висаджувати рослини-регенеранти у ґрунтові суміші і польові умови (табл.).
 - 50 Спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambeabyssinica* Hochst) за використанні умов *in vitro* здійснюється таким чином: вихідним матеріалом служить насіння крамбе і проводять його попередню обробку - промивання в проточній воді з мийним засобом. Для стерилізації використовують 35 % розчин Білизни за експозиції 20 хвилин. Стерильний матеріал висаджують на живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга з повним набором та з додаванням БАЛ
 - 55 0,5 мг/л і сахарози 30,0 г/л і агар-агару 8,0 г/л. Умови культивування: довжина фотоперіоду 16/8 годин та температура 24±2 °С. Для ризогенезу використовують живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга з повним набором з модифікацією ІОК і НОК - 0,3 мг/л, та сахарози 30,0 г/л і агар-агару 8,0 г/л. Придатність рослин до пересаджування у ґрунт можливо проводити на 20 добу.
 - 60

Показники ефективності використання запропонованого способу вегетативного розмноження крамбе

Показники	Відомий спосіб	Запропонований спосіб
Експлант	насіння	насіння
Попередня обробка	промивання в проточній воді з мийним засобом	промивання в проточній воді з мийним засобом
Стерилізація	розчин антибіотика пеніцилін (10 мг/л) та рифампіцин (10 мг/л та 70 % спирту та гіпохлорит натрію 50 %	Білізна - 35 %
Експозиція, хв	30 і 1 та 30	20
Мінеральна основа середовища для розмноження і укорінення	MS ^{1/2} і MS ^{1/4}	MS
БАП, мг/л	-	0,5
Сахароза для розмноження і укорінення, г/л	7,0/-	30,0/30,0
ІОК, мг/л	-	0,3
НОК мг/л	-	0,3
Агр-агр для розмноження і укорінення, г/л	15,0 і 7,5	8,0 і 8,0
Субстрат	комерційний (Vivato Slim®)	ґрунт-пісок
Довжина фотоперіоду, годин	16/8	16/8
Температура культивування, °С	25±1	24±2
Придатність рослин до пересаджування у ґрунт, доба	30	20

Впровадження запропонованої корисної моделі дає можливість підібрати умови попередньої обробки насіння та стерилізації і експозиції, забезпечити збільшення кількості життєздатних експлантів, збалансувати склад фітогормонів і вуглеводів у живильних середовищах, дозволяє вводити насіння крамбе в штучні умови і отримувати рослини-регенеранти, збільшити коефіцієнт розмноження і ризогенезу та проводити адаптацію укорінених клонів у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб вегетативного розмноження крамбе (*Crambe abyssinica* Hochst.) за використання умов *in vitro*, що включає використання насіння, знезараження матеріалу перед введенням в асептичні умови, промивання у автоклавованій дистильованій воді, приготування живильних середовищ за прописами Мурасіге і Скуга, додавання сахарози, укорінення і адаптацію рослин, який **відрізняється** тим, що використовують як стерилізатор розчин 35 % Білізни, для розмноження і укорінення застосовують повний склад мінеральної основи середовища MS з модифікаціями, бензиламінопурин (БАП) для розмноження та індолілоцтову кислоту (ІОК) і нафтилоцтову кислоту (НОК) для ризогенезу, здійснюють додавання сахарози для укорінення і розмноження та агар-агар і проводять пересаджування рослин у відкритий або закритий ґрунт на 20 добу.